



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**XENOMAR**  
Genética de organismos marinos

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE GENÉTICA

# **ANÁLISIS GENÉTICO EN LA COQUINA *Donax trunculus* MEDIANTE MARCADORES DE ADN MITOCONDRIAL**

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA  
(2013-2014)

Trabajo de Fin de Máster presentado por

**Jenyfer Fernández Pérez**

Julio 2014





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

La Dra. **Josefina Méndez Felpeto**, Catedrática de Universidad y coordinadora del grupo XENOMAR, y Dña. **Ana Nantón Varela**, Investigadora contratada FPU del Área de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña.

INFORMAN:

Que el presente Trabajo Fin de Máster titulado “**ANÁLISIS GENÉTICO EN LA COQUINA *Donax trunculus* MEDIANTE MARCADORES DE ADN MITOCONDRIAL**” presentado por Dña. Jenyfer Fernández Pérez, ha sido elaborado bajo nuestra supervisión y, considerándolo finalizado, damos nuestro visto bueno para su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 18 de Julio de 2014

Fdo.: Josefina Méndez Felpeto

Fdo.: Ana Nantón Varela



A mi abuela,  
que me ha dejado su fuerza, su carácter y su sonrisa, la herencia materna que nunca olvidaré.



# ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivo</b> .....	<b>7</b>
<b>Material y métodos</b> .....	<b>9</b>
Material de estudio.....	9
Extracción de ADN genómico .....	9
Identificación taxonómica.....	10
Amplificación por PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) y secuenciación.....	11
Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional .....	11
<b>Resultados</b> .....	<b>15</b>
Identificación taxonómica.....	15
Análisis del modo de herencia .....	15
Análisis de secuencias.....	16
Relaciones entre haplotipos .....	18
Análisis de la diversidad genética.....	21
Análisis de diferenciación poblacional .....	22
<b>Discusión</b> .....	<b>25</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>29</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>31</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>37</b>

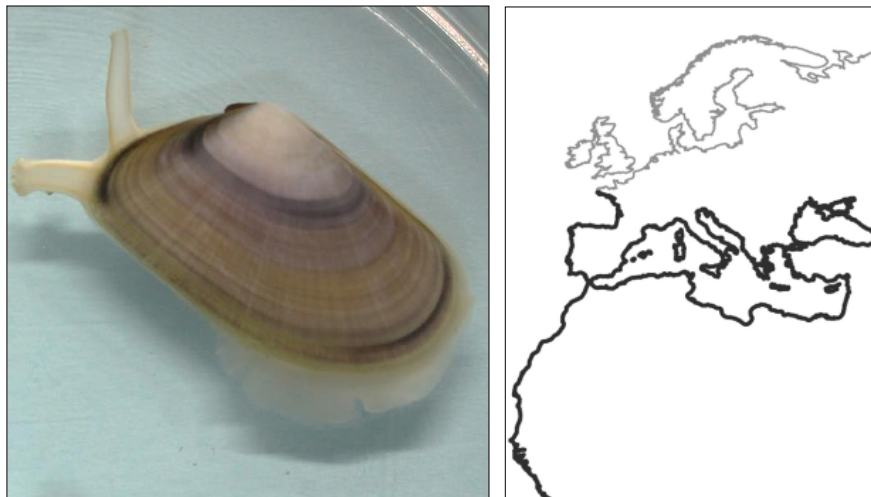




## **Introducción**



La coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758) (Figura 1 A) es un molusco bivalvo perteneciente a la familia Donacidae, una de las seis que conforman la superfamilia Tellinacea. Es una especie con una amplia distribución Atlántico-Mediterránea. Se encuentra en todo el mar Mediterráneo, en el mar Negro y en el océano Atlántico, donde aparece desde Senegal hasta el norte de Francia (Bayed y Guillou, 1985; Tebble, 1966) (Figura 1 B). En el Arco Atlántico, habita en la franja intermareal, entre las líneas de bajamar y pleamar en playas expuestas, dominadas por los procesos físicos de las mareas y la acción del oleaje. Vive enterrada en bancos arenosos a una profundidad que varía de 0 a 6 m, con densidades más altas entre 0 y 3 m. Es un excelente excavador, lo que hace que esté bien adaptado a la vida en la zona de resaca (Gaspar *et al.*, 1999).



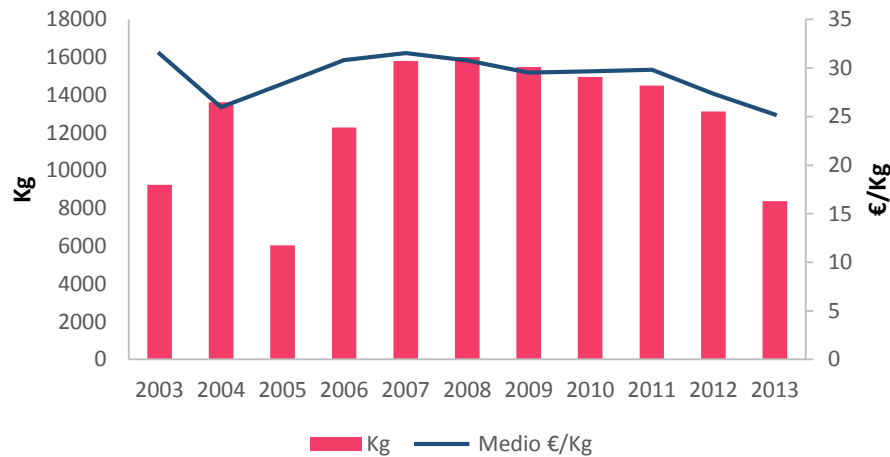
**Figura 1.** (A) *D. trunculus*. (B) Distribución geográfica de *D. trunculus*. (Fuente: Xunta de Galicia. Plataforma Tecnológica da Pesca).

Las especies del género *Donax* son explotadas comercialmente en algunos países como Portugal (Gaspar *et al.*, 1999; Chícharo *et al.*, 2002), Italia (Zeichen *et al.*, 2002), Francia (Thébaud *et al.*, 2005) y España (Ramón *et al.*, 2005; Molaes *et al.*, 2008). En Galicia, *D. trunculus* se considera una especie recurso debido a su elevado índice de cotización, siendo el bivalvo con mayor valor económico (25,21 €/kg) en las lonjas gallegas durante el año 2013 (Tabla I).

**Tabla I.** Nivel de capturas (kg) y valor económico (€) de moluscos bivalvos descargados en las lonjas gallegas durante el año 2013. Los datos proceden del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia ([www.pescadegalicia.com](http://www.pescadegalicia.com)).

Especie	kg	Importe €	Medio €/kg
Ameixa babosa	1129407,89	12353501,68	10,94
Ameixa bicuda	4281,66	16211,96	3,79
Ameixa fina	733370,86	13447002,37	18,34
Ameixa rubia	377373,43	2651329,28	7,03
Ameixa xaponesa	1937551,51	10412006,17	5,37
Ameixón	11708	11070,75	0,95
Berberecho	1776473,44	7480318,71	4,21
Birollo	57346,2	266298,32	4,64
<b>Coquina</b>	<b>8385,1</b>	<b>211408,46</b>	<b>25,21</b>
Carneiro	76333,65	273467,01	3,58
Cornicha	4291,75	18624,82	4,34
Longueirón	68139,06	383273,59	5,62
Longueirón vello	450,25	1164,53	2,59
Navalla	372488,6	2453274,45	6,59
Ostra plana	25855,46	126827,18	4,91
Ostra rizada	13293,3	13054,52	0,98
Rabioso	9325	7460	0,8
Vieira	132206,91	474319,29	3,59
Volandeira	242566,3	472052,55	1,95
Zamburiña	67	268	4
<b>TOTAL</b>	<b>6980915,37</b>	<b>51072933,64</b>	

La evolución de la producción de coquina desde 2003 en Galicia se muestra en la Figura 2, donde se aprecia una notable disminución en 2005 respecto al año anterior y una recuperación en los años siguientes, alcanzando en 2008 el valor máximo (16.003,96 kg). A partir de este año, vuelve a darse un declive paulatino hasta el 2013. Este descenso se debe probablemente a la sobreexplotación a la que se ha visto sometida esta especie, provocando que los bancos naturales en la costa gallega estén en regresión. Dado este descenso de producción, existe especial interés en la realización de estudios que permitan su recuperación y su gestión sostenible. No obstante, es conocido que las técnicas de repoblación pueden tener efectos deletéreos en la composición genética de las poblaciones naturales, como la pérdida de adaptación a condiciones locales o la pérdida de variabilidad (Ward, 2006). En consecuencia, para desarrollar una acuicultura sostenible y programas de repoblación adecuados, debe evaluarse tanto la estructura como la variación genética de los bancos naturales (Joaquim *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Evolución de la producción comercial en kg de coquina y de su precio (€/kg) en los últimos diez años. Los datos proceden del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia ([www.pescadegalicia.com](http://www.pescadegalicia.com)).

Los estudios genéticos de *D. trunculus* son muy escasos y se limitan a la descripción del cariotipo (Cornet & Soulard, 1990; González-Tizón *et al.*, 1998) y el análisis de elementos móviles y ADN satélite (Plohl & Cornudella, 1996, 1997; Plohl *et al.*, 2002; Petrovic & Plohl, 2005; Petrovic *et al.*, 2009; Satovic & Plohl, 2013). Estos trabajos resultan insuficientes para asesorar la gestión de los bancos naturales. Recientemente, se han desarrollado 19 marcadores microsatélites en *D. trunculus*, lo que proporcionará una herramienta muy valiosa para futuros estudios de genética de poblaciones, cultivo y gestión de esta especie (Nantón *et al.*, 2014).

Los marcadores moleculares son herramientas que posibilitan los estudios genéticos necesarios para el análisis de las poblaciones naturales. Dentro de los diferentes tipos de marcadores moleculares debemos destacar los relacionados con el ADN mitocondrial (ADNmt), ya que resultan muy útiles en diferentes estudios de identificación de especies, genética de poblaciones y filogeografía (Awise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Hebert *et al.*, 2003; Galtier *et al.*, 2009).

El ADNmt es una molécula circular, cerrada y bicatenaria (constituida por una cadena pesada “H” y otra ligera “L”), aunque existen excepciones, como en algunos Cnidarios donde está constituido por una o dos moléculas lineales o en algunos Hidrozos (*Hydra* spp.) en los que es una única molécula lineal (Warrior & Gall, 1985). En animales, las moléculas de ADNmt son generalmente pequeñas (15-20 kb) (Boore, 1999) y las diferencias de tamaño entre especies se deben a menudo a secuencias repetidas presentes en la región de control (Wolstenholme, 1992). En general, el ADNmt codifica para 37 genes, 2 de los cuales lo hacen para ARNs de

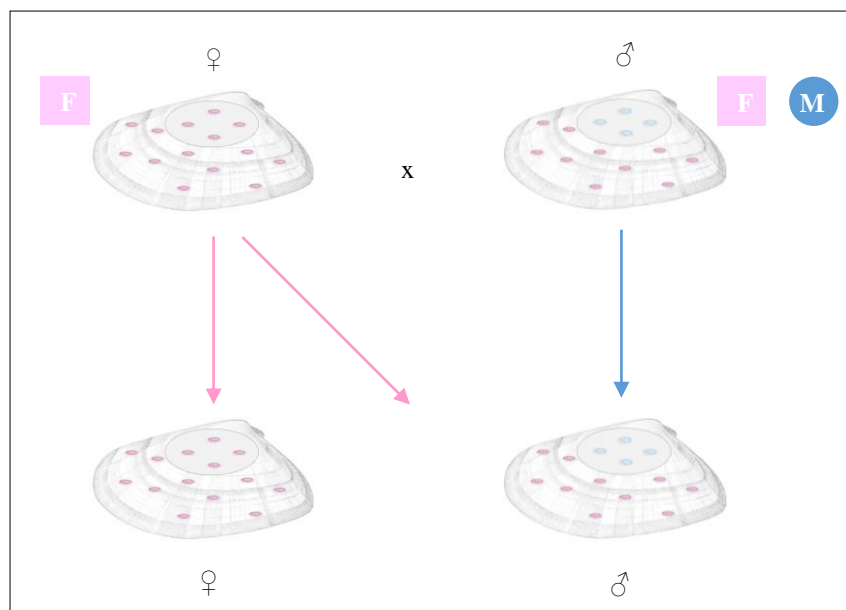
los ribosomas mitocondriales (12S y 16S), 22 para ARNs transferentes y 13 para proteínas, que en su mayoría son subunidades de diferentes complejos multienzimáticos implicados en la cadena de transporte electrónico y en la fosforilación oxidativa, como son la NADH deshidrogenasa (subunidades 1-6 y la 4L), la citocromo c oxidasa (subunidades I-III), la ATP sintetasa (ATPasa subunidades 6 y 8) y el citocromo b (CitB) (Wolstenholme *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1992).

Existen varias razones que justifican la utilización de regiones de ADNmt como marcadores moleculares. Una de ellas es que es relativamente fácil de amplificar, ya que existen múltiples copias por célula y el contenido en genes mitocondriales está altamente conservado entre animales, con muy pocas duplicaciones, sin intrones y/o regiones intergénicas muy cortas (Gissi *et al.*, 2008). Además, el ADNmt es altamente variable en las poblaciones naturales debido a su elevada tasa de mutación, lo que puede aportar información sobre la historia evolutiva reciente. Otro aspecto de interés es que, el ADNmt presenta propiedades biológicas específicas, como su herencia clonal (generalmente materna y sin recombinación genética) lo que significa que todo el genoma se comporta como uno solo y todas las regiones comparten una genealogía común. También se ha supuesto que el ADNmt evoluciona de una manera casi neutra. Además, la tasa de evolución del ADNmt ha sido frecuentemente asumida como reloj molecular, puesto que en ausencia de cualquier mutación difundida a través de la selección positiva y teniendo en cuenta solamente mutaciones neutrales que se acumulan en el tiempo, los niveles de divergencia del ADNmt deberían revelar más o menos el tiempo de divergencia entre especies (Ballard & Whitlock, 2004; Ballard & Rand, 2005; Galtier *et al.*, 2009). Por tanto, aparentemente el ADNmt podría ser un reflejo de la historia de la población y de las especies en particular. Sin embargo, estas propiedades parece que no siempre se cumplen, al encontrarse evidencias de selección positiva y tasas de mutación heterogéneas (Galtier *et al.*, 2009). Finalmente, el tamaño efectivo del ADNmt es un cuarto del ADN nuclear (asumiendo igual proporción de sexos) por lo que es más sensible a la deriva genética y presenta mayor resolución para detectar cambios poblacionales que los marcadores nucleares (Birky *et al.*, 1983).

A pesar de que las propiedades evolutivas del ADNmt puedan diferir de lo que tradicionalmente se ha supuesto, la utilización de regiones mitocondriales como marcadores moleculares en el análisis de la diversidad genética está ampliamente extendida. La existencia de múltiples copias de ADNmt en la célula y de regiones variables flanqueadas por secuencias conservadas apropiadas para el diseño de cebadores de PCR hace que el análisis del ADNmt

constituya una de las formas más sencillas y baratas para caracterizar genéticamente una nueva especie, incluso en organismos no modelo donde el conocimiento de la secuencia de ADNmt es todavía insuficiente para el diseño de cebadores (Galtier *et al.*, 2009).

En general, el modo de transmisión del ADNmt es uniparental (Birky, 1995), y el gameto a través del cual se hereda suele ser el materno (SMI, *Strict Maternal Inheritance*) (Awise, 1989). Sin embargo existen excepciones, en algunas especies de moluscos bivalvos se ha descrito un tipo de herencia característica denominada doble herencia uniparental (DUI, *Doubly Uniparental Inheritance*), la cual no sigue las leyes genéticas mendelianas. En este modo de transmisión existen dos tipos de ADNmt, uno que se transmite a través de los óvulos tanto a descendientes machos como hembras (tipo F), y otro que se transmite a través de los espermatozoides sólo a los machos (tipo M) (Figura 3). Aunque existen algunas excepciones ocasionales, las hembras adultas son homoplásmicas para el tipo F y los machos son mosaicos heteroplásmicos, en los que el tipo F predomina en los tejidos somáticos y el tipo M en el tejido gonadal (Fisher & Skibinski, 1990; Hoeh *et al.*, 1991; Zouros *et al.*, 1992; Zouros *et al.*, 1994 a, b).



**Figura 3.** Sistema DUI en *D. trunculus*: mitocondrias que portan ADNmt tipo F (rosa) y tipo M (azul).

Este tipo de herencia se presenta en *D. trunculus* (Theolodigis *et al.*, 2008), y al menos en otras 45 especies pertenecientes a seis familias diferentes de bivalvos: Hyriidae, Margaritiferidae, Mytilidae (Fisher & Skibinski, 1990; Skibinski *et al.*, 1994 a, b; Zouros *et al.*,

1994 a, b), Solenidae, Unionidae (Liu *et al.*, 1996; Hoeh *et al.*, 2002) y Veneridae (Passamonti & Scali, 2001; Breton *et al.*, 2007). Recientemente, también se ha encontrado en Nuculanidae (Boyle & Etter, 2013).

La detección de DUI en una nueva especie de bivalvo ayuda a conocer la magnitud de este fenómeno y a descifrar el puzzle de su evolución. Sin embargo, este modo de herencia podría interferir en la interpretación de los datos de estudios poblacionales. Así, en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* se ha demostrado que los dos tipos de ADNmt (M y F) aportan diferente información respecto al grado de variación y distancia genética entre poblaciones; el tipo F muestra mayor diversidad dentro de las poblaciones, mientras que el tipo M revela mayor diferenciación entre las poblaciones (Ladoukakis *et al.*, 2002). Por tanto, el sistema DUI es un excelente modelo de estudio de cuestiones biológicas, pues la combinación de ambos tipos de ADNmt puede ofrecer nuevos conocimientos sobre la historia evolutiva y la estructura filogeográfica de las especies que presentan este sistema de herencia, pudiendo ser útiles para fines filogenéticos y proporcionar herramientas valiosas para futuras evaluaciones de genética de poblaciones y conservación de especies (Passamonti & Scali., 2001; Breton *et al.*, 2009).

Como hemos indicado previamente, para abordar cualquier problema de recuperación de bancos naturales, es imprescindible llevar a cabo estudios genéticos que nos informen de la situación de los individuos de las localidades. Los análisis de diversidad y diferenciación genética permiten obtener datos que contribuyen a la gestión sostenible. En el caso de encontrarse diferenciación genética en las localidades analizadas, ésta debería considerarse tanto en los planes de extracción como de repoblación, ya que excesos en las capturas podrían llevar a la extinción de bancos y la repoblación tendría que respetar la diferenciación existente para no aumentar el riesgo de provocar cambios genéticos no intencionados o reducir la adaptación a las condiciones locales.

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto de investigación “Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia (PGIDIT-CIMA 13/08)” financiado por la Consellería do Medio Rural e do Mar de la Xunta de Galicia y llevado a cabo por el grupo de investigación XENOMAR (Xenética de Organismos Mariños) de la Universidade da Coruña.



## **Objetivo**



El presente trabajo tiene como objetivo general el análisis de la diversidad genética y la estructura poblacional de *D. trunculus* en cinco localidades de la Península Ibérica mediante los marcadores mitocondriales citocromo b (CitB) y subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI).

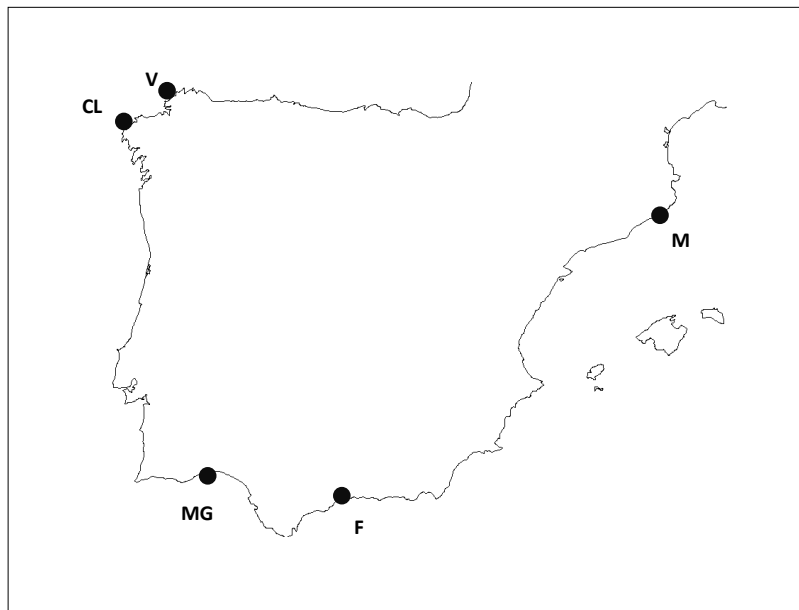


## **Material y Métodos**



## Material de estudio

Se utilizaron muestras de *D. trunculus* recolectadas en bancos naturales de cinco localidades de la Península Ibérica: Vilarrube y Ría de Corme-Laxe (A Coruña), Fuengirola (Málaga), Maresme (Barcelona) y Monte Gordo (Portugal) (Figura 4). Una vez en el laboratorio, los ejemplares se diseccionaron y se mantuvieron en etanol al 96% para su conservación hasta su utilización.



**Figura 4.** Situación geográfica de las localidades examinadas de *D. trunculus*. V: Vilarrube, CL: Corme-Laxe; MG: Monte Gordo; F: Fuengirola y M: Maresme.

Todos los individuos se sexaron mediante observación al microscopio óptico de preparaciones de tejido gonadal. Puesto que los ejemplares estaban conservados en etanol al 96%, se procedió a la rehidratación de una porción de tejido gonadal en 500  $\mu$ l de 1x PBS (tampón fosfato alcalino) durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se disgregó el tejido con la ayuda de unas pinzas y se montó la preparación microscópica.

## Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico total se realizó a partir de tejido muscular y/o gonadal siguiendo el método descrito por Walsh *et al.* (1991) que emplea la resina Chelex 100™ (Sigma-Aldrich). Una porción de tejido de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> se introdujo en 100  $\mu$ l de

Chelex 100™ al 10% (g/ml) en agua milliQ estéril y se incubó a 100°C durante 20 min. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron 1 min a 13000 rpm y se recogió el sobrenadante transfiriéndolo a un nuevo tubo. La cuantificación del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Technologies, Inc.).

### **Identificación taxonómica**

La coquina *D. trunculus* puede compartir nicho ecológico con otras especies del género *Donax* como *D. semistriatus*, *D. vittatus* y *D. variegatus*, y aunque éstas se pueden distinguir por sus características morfológicas, no es una tarea sencilla. De hecho, *D. trunculus* y *D. variegatus* son muy similares en tamaño, forma y color. Con el fin de identificar de manera inequívoca los individuos utilizados en este estudio, se realizó el método descrito por Pereira *et al.* (2012) basado en la amplificación del marcador nuclear 5S ADNr.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía 150 ng de ADN genómico extraído a partir de tejido muscular, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, 0,25 mM de dNTPs, 0,6 µM de cada cebador y agua milliQ estéril. Los cebadores utilizados fueron los diseñados por Fernández-Tajes y Méndez (2007) (5SF: – 5' CGTCCGATCACCGAAGTTAA 3'– y 5SR: – 5' ACCGGTGTTTTCAACGTCAT 3'–). También se amplificaron individuos control de las especies *D. semistriatus*, *D. vittatus* y *D. variegatus*, disponibles en el laboratorio.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad). El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 34 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 40 s, y una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en tampón 1x TAE aplicando 5 µl de producto de PCR y 1 µl de tampón de carga. La longitud de los fragmentos se determinó por comparación con el marcador XIV de Roche de peso molecular conocido (100 – 1500 pb). El progreso de migración de la electroforesis se observó mediante el colorante azul de bromofenol y xileno cianol incluidos en el tampón de carga. La electroforesis se realizó a 90-120 V y se dejó correr hasta que el azul de bromofenol alcanzó los 2/3 del gel. Posteriormente, se tiñó por inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/ml en 1xTAE) durante 30 min y se visualizó en un transiluminador Gel Doc XR (Bio-Rad).



## **Amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y secuenciación**

La amplificación de la región del gen *CitB* se llevó a cabo empleando los cebadores descritos por Theologidis *et al.* (2008) (DTCYTB-F: –5' TGTCGTATTGGGGGGCTACTG 3'– y DTCYTB-R: – 5'GTACCACTCTGGCTGAATGTG 3'–) a partir de ADN extraído de músculo y gónada. El fragmento del gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI) se amplificó a partir de ADN extraído de ambos tejidos empleando los cebadores específicos descritos por Nantón *et al.* (pendiente de publicación).

En todos los casos, las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 25 µl, conteniendo 100 ng de ADN, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, 0,25 mM de dNTPs, agua milliQ estéril y 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> para el gen COI y 2,5 mM para el gen *CitB*.

Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad). El programa de amplificación utilizado para el gen *CitB* consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min y 20 s y 72°C durante 1 min, y una extensión final de 5 min a 72°C. Para la amplificación del gen COI, el programa utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguida de 34 ciclos de 94°C durante 45 s, 56°C durante 45 s y 72°C durante 45 s, y una extensión final de 3 min a 72°C.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, según se ha descrito anteriormente.

La secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) en los Servicios de Apoio á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña empleando el cebador *forward* correspondiente en cada caso.

## **Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional**

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999) eliminando los extremos de las secuencias donde la lectura no era fiable. Posteriormente, se sometieron a un análisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997) para verificar su identidad y se alinearon con Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), tanto por separado como conjuntamente. Además, al tratarse de genes codificantes de proteínas, los alineamientos se realizaron tanto con las secuencias nucleotídicas, respetando la pauta de

lectura, como con las secuencias aminoacídicas para calcular las sustituciones sinónimas y no sinónimas. Los análisis se realizaron para cada gen y tipo de ADNmt por separado, y también combinando las secuencias del gen CitB tipo F y el gen COI.

Por otro lado, se analizaron las relaciones filogenéticas entre las secuencias tipo F y tipo M del gen CitB. Las frecuencias de las secuencias se emplearon para calcular la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) y construir un árbol *Neighbor-joining* con el paquete de programas Phylip (Felsenstein, 1993). La robustez de los árboles se determinó mediante el método de *bootstrap*, realizándose 10000 réplicas.

La heterogeneidad genética dentro de las localidades se estimó como diversidad haplotípica ( $h$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).

La diversidad haplotípica ( $h$ ) indica la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una localidad sean distintos y se calcula a partir de la siguiente ecuación (Nei, 1987):

$$h = 2n(1 - \sum x_i^2)/(2n - 1)$$

donde  $n$  es el número de secuencias examinadas y  $x_i$  es la frecuencia de la secuencia  $i$  en la localidad X.

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) indica la probabilidad de que dos nucleótidos con posiciones homólogas tomados al azar sean diferentes, es decir, el número medio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias. Para calcularla se emplea la siguiente ecuación (Nei, 1987):

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

donde  $n$  es el número de secuencias examinadas,  $x_i$  y  $x_j$  son las frecuencias de las secuencias  $i$  y  $j$ , y  $\pi_{ij}$  es la proporción de nucleótidos diferentes entre los tipos  $i$  y  $j$ .

Estos dos índices, así como la reconstrucción de los haplotipos, se calcularon con el programa DnaSP versión 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2009). Además, se empleó el programa Arlequín versión 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) para el cálculo de las frecuencias haplotípicas.

Para analizar los cambios demográficos dentro de las poblaciones se utilizó el test  $F_S$  de Fu (Fu, 1997) implementado en el DnaSP versión 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2009). Este estadístico

se calcula a partir de la probabilidad ( $S'$ ) de tener una muestra aleatoria con un número de alelos mayor o igual que el observado dado el nivel de diversidad estimado.

$$F_S = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

Un valor negativo de  $F_S$  evidencia un exceso de haplotipos, esperable en una situación de expansión poblacional reciente o selección purificadora. Un valor positivo evidencia un déficit de haplotipos, esperable en una situación de cuello de botella reciente, o sobredominancia. La significación del estadístico se obtuvo por simulación coalescente (1000 réplicas).

Las relaciones filogenéticas entre haplotipos se describen mediante un árbol de redes, construido con el programa Network versión 4.6 (Fluxus Technology Ltd.), aplicando el algoritmo *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) que establece las redes de haplotipos a partir de todos los árboles filogenéticos posibles más parsimoniosos.

Las estimas de diferenciación poblacional se calcularon a través de un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) (Excoffier & Lischer, 2010) empleando el programa Arlequín versión 3.5.1.2. Este programa también se utilizó para estimar los valores  $F_{ST}$  por pares de localidades en base a las frecuencias haplotípicas. La distribución de los  $F_{ST}$ 's se obtuvo por *bootstrapping* (1000 réplicas) y los correspondientes  $P$ -valores se corrigieron empleando la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

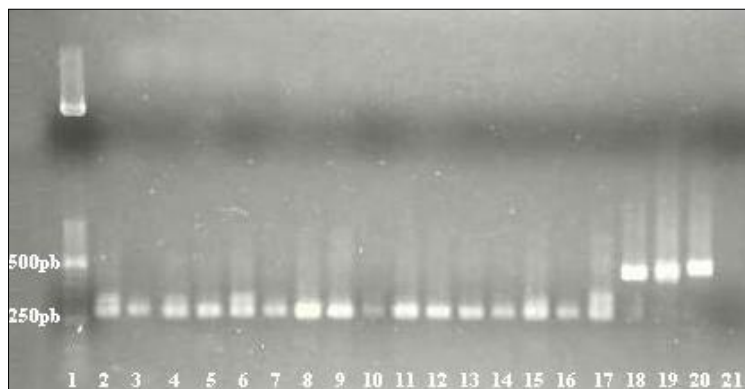


## **Resultados**



## Identificación taxonómica

El método de PCR descrito por Pereira *et al.* (2012), basado en la amplificación del marcador nuclear 5S ADN<sub>r</sub>, permitió corroborar que todos los individuos utilizados en este estudio corresponden a *D. trunculus*, ya que presentaron fragmentos con una longitud comprendida entre 275-300 pb, mientras que los fragmentos de las otras especies mostraron tamaños comprendidos entre 400-500 pb (Figura 5).



**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación 5S de diferentes especies de *Donax* tras teñir con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio. Carril 1: Marcador XIV de Roche de peso molecular 100 – 1500 pb; carriles 2-16: individuos objeto de estudio; carril 17: *D. trunculus*; carril 18: *D. variegatus*; carril 19: *D. vittatus*; carril 20: *D. semistriatus* y carril 21: control negativo.

## Análisis del modo de herencia

Dado que en *D. trunculus* está descrita la existencia de DUI (Theologidis *et al.*, 2008), se realizó una prueba preliminar con los genes CitB y COI para comprobar la amplificación de los dos tipos de ADN<sub>mt</sub> (F y M). Ambos genes se amplificaron a partir de ADN extraído de tejido muscular y gonadal de diez machos y diez hembras para obtener su secuencia. Con respecto a las secuencias obtenidas para la región COI no se observaron diferencias asociadas al sexo, por lo que este gen se amplificó en todos los individuos analizados a partir de tejido muscular únicamente. Sin embargo, en el caso de la región del gen CitB, las secuencias amplificadas a partir de ADN extraído de gónada de hembras y de músculo de ambos sexos presentaron un elevado número de diferencias con las secuencias obtenidas a partir de ADN de gónada de machos. Estas secuencias fueron alineadas con las secuencias CitB tipo F y M de *D. trunculus* depositadas en bases públicas (GenBank EF417554.1 y EF417555.1, respectivamente). Las

secuencias amplificadas a partir de ADN de gónada de hembras y a partir de músculo de ambos sexos mostraron un elevado grado de similitud con la secuencia del gen CitB tipo F descrita para *D. trunculus*. Mientras que, las secuencias obtenidas a partir de gónada de machos presentaron una mayor similitud con la secuencia de CitB tipo M. Por este motivo, en los análisis posteriores se amplificó el gen CitB a partir de ADN extraído de músculo de machos y hembras para obtener la secuencia del gen CitB tipo F y a partir de gónada de machos para conocer el tipo M.

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre los dos tipos de ADNmt (F y M), mediante el algoritmo *Neighbor-joining* y la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), dio lugar a un árbol donde las secuencias forman dos grupos diferenciados, uno agrupa las secuencias tipo F y el otro las secuencias tipo M. La significación de la rama fue elevada, con un valor *bootstrap* del 100% (Anexo I).

### **Análisis de secuencias**

Para el gen CitB se amplificó y secuenció un fragmento de 430 pb, en el caso del tipo F en un total de 135 individuos (70 hembras y 65 machos) y en el caso del tipo M en un total de 72 individuos. Tras eliminar los cebadores y las regiones de alineamiento dudoso, los fragmentos resultaron de 329 y 326 pb, respectivamente. El alineamiento de las secuencias de tipo F permitió identificar 47 haplotipos definidos por 60 sustituciones nucleotídicas, 48 debidas a sustituciones sinónimas y 12 a sustituciones no sinónimas. Mientras que, el alineamiento de las secuencias de tipo M reveló un total de 60 sustituciones nucleotídicas, 41 debidas a sustituciones sinónimas y 19 a no sinónimas, definiéndose un total de 30 haplotipos (Anexos II y III).

En el caso del gen CitB tipo F, el haplotipo 1 fue el más abundante (48,15%), estando presente en todas las localidades con frecuencias entre 22,2% y 64,3%. Otros seis haplotipos fueron compartidos por un mínimo de 2 y un máximo de 4 localidades. Los haplotipos restantes fueron haplotipos privados o característicos de cada localidad presentes en 1-5 individuos. La localidad con más haplotipos fue Monte Gordo, con un total de 15. La localidad con más haplotipos privados resultó ser Maresme (12) y la que menos Corme-Laxe (5), mientras que la localidad con más haplotipos únicos fue Monte Gordo (10) (Anexos II y IV).

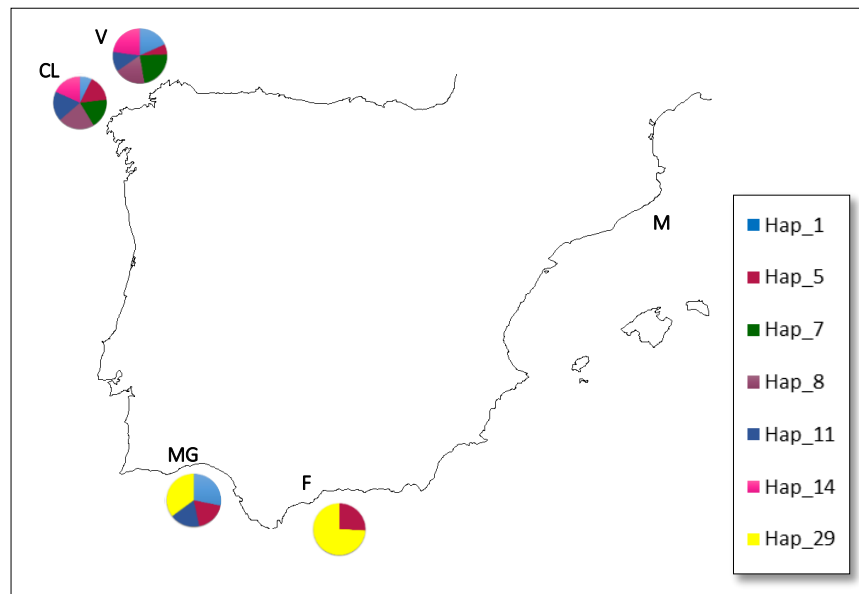
En el caso del gen CitB tipo M, el haplotipo 3 fue el más común (40,28%), encontrándose en todas las localidades, a excepción de Maresme, con frecuencias entre 33,3% y 84,6%. Los



haplotipos 1 y 4 aparecieron en dos localidades (Vilarrube y Monte Gordo) y los 27 haplotipos restantes fueron haplotipos privados. La localidad con mayor número de haplotipos así como haplotipos únicos fue Vilarrube (10 y 9 respectivamente). La localidad de Maresme no compartió haplotipos con ninguna localidad por lo que todos los haplotipos fueron privados. La localidad con menor número de haplotipos privados fue Corme-Laxe (2) (Anexos III y V).

Del gen COI se amplificó y secuenció un fragmento de 509 pb en un total de 145 individuos. No obstante, el fragmento analizado fue de 430 pb tras eliminar la secuencia de los cebadores y las regiones de alineamiento dudoso. El alineamiento de las 145 secuencias permitió identificar 60 haplotipos definidos por 78 sustituciones nucleotídicas, 63 de las cuales fueron debidas a sustituciones sinónimas y las 15 restantes a sustituciones no sinónimas. El haplotipo 2 fue el más común (28,28%), estando presente en todas las localidades, con frecuencias entre 19,51% y 34,15%, y en un total de 41 individuos. La localidad con más haplotipos fue Fuengirola, con un total de 23. Once de los haplotipos fueron compartidos entre 2-4 localidades y los haplotipos restantes fueron privados, generalmente presentes en 1 o 2 individuos. La localidad que presentó el mayor número de haplotipos privados y únicos fue Fuengirola (17 y 21 respectivamente) y la que menos Corme-Laxe (3 y 1 respectivamente) (Anexos VI y VII).

La combinación de las secuencias de los genes CitB tipo F y COI dio lugar a un fragmento de 759 pb en 122 individuos. El alineamiento de las secuencias combinadas permitió la identificación de 78 haplotipos y un total de 133 sitios variables. El haplotipo 5 fue el más común (18,85%) apareciendo en un total de 23 individuos y en cuatro de las cinco localidades (excepto Maresme) con frecuencias entre 43,48% y 13,04%. Las localidades con más haplotipos fueron Monte Gordo y Maresme, con 20 haplotipos cada una. Seis haplotipos fueron compartidos entre 2-3 localidades y todos los demás resultaron ser haplotipos privados, siendo Maresme la localidad con mayor número de ellos (20), de hecho no presentó ningún haplotipo compartido. Esto mismo se puede visualizar al superponer los haplotipos compartidos de las secuencias combinadas en un mapa geográfico (Figura 7) donde se observa un escenario de estructuración genética en el que Maresme no comparte ningún haplotipo con el resto de localidades, mientras que los haplotipos compartidos por las localidades de Vilarrube y Corme-Laxe presentan frecuencias similares, y las localidades de Monte Gordo y Fuengirola comparten el haplotipo 29 a elevada frecuencia. Una vez más, Corme-Laxe fue la localidad con menos haplotipos privados (8). La localidad con más haplotipos únicos fue Monte Gordo, con un total de 18 (Anexo VIII).



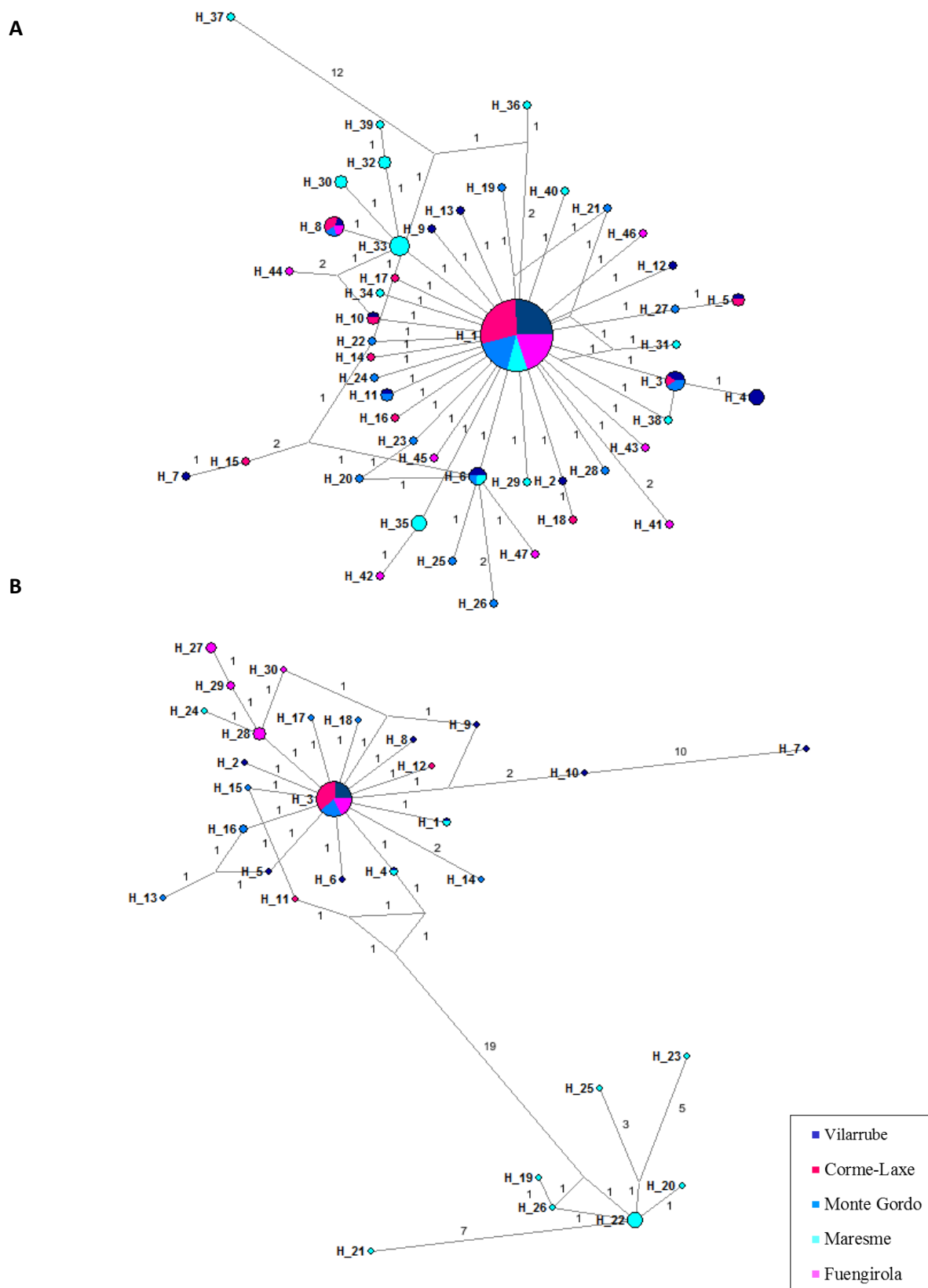
**Figura 7.** Distribución de los haplotipos compartidos de las secuencias combinadas en las localidades de estudio. Los haplotipos se representan en colores y los sectores de los gráficos son proporcionales a las frecuencias haplotípicas. Los haplotipos privados no aparecen representados.

### Relaciones entre haplotipos

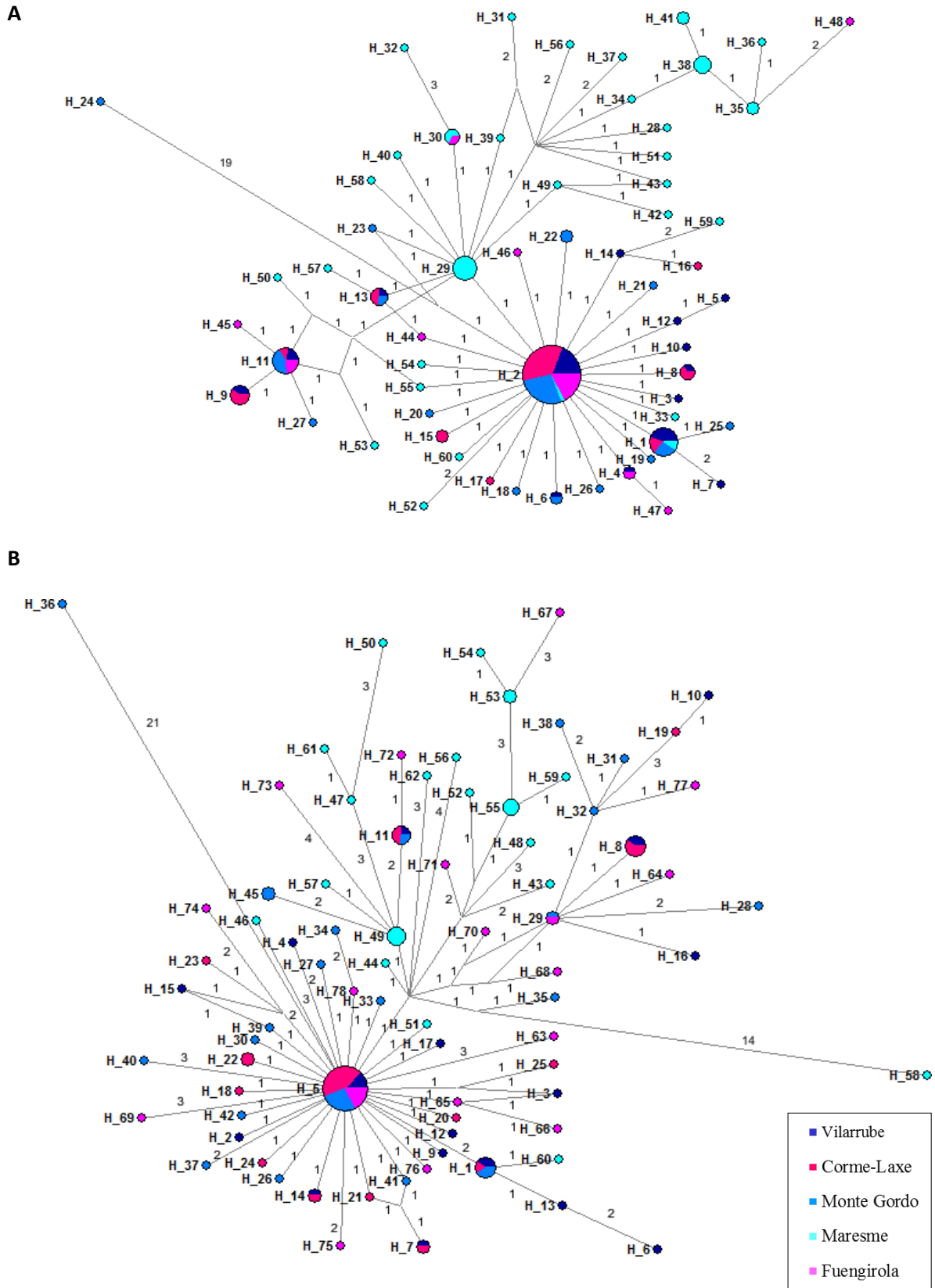
Las relaciones entre los diferentes haplotipos identificados se analizaron a través de las redes de haplotipos (Figuras 8 y 9).

Las redes de haplotipos construidas para cada uno de los genes (CitB tipo F, CitB tipo M y COI), así como la construida para la combinación de los genes CitB tipo F + COI, muestran en todos los casos una estructura estrellada con todos los haplotipos estrechamente relacionados con el más frecuente. Esta morfología es característica de procesos de expansión poblacional. Además, se caracterizan por una gran presencia de haplotipos privados que, en su mayoría, están relacionados con el haplotipo central más abundante, siendo éste el haplotipo ancestral a partir del cual derivarían todos los demás.

Sin embargo, en las redes de haplotipos elaboradas para el gen CitB tipo M y las secuencias combinadas, se observa que todas las localidades comparten el haplotipo más común a excepción de Maresme, aportando evidencias de diferenciación genética entre la localidad catalana y todas las demás (Figuras 8 B y 9 B). Además, la red de haplotipos del gen CitB tipo M evidencia dos haplogrupos interconectados con una estructura de estrella y centrados en los haplotipos más frecuentes 3 y 22. Los haplotipos 19-23, 25 y 26, pertenecientes a la localidad de Maresme, forman en conjunto un haplogrupo, difiriendo del otro en al menos 19 cambios nucleotídicos (Figura 8 B).



**Figura 8.** Árboles de redes con las relaciones inferidas entre los haplotipos de los genes (A) CitB tipo F y (B) CitB tipo M. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia relativa del haplotipo y los colores representan la contribución de cada localidad al haplotipo. Los números representados en las ramas indican el número de cambios que dieron lugar al haplotipo.



**Figura 9.** Árboles de redes con las relaciones inferidas entre los haplotipos (A) del gen COI y (B) de las secuencias combinadas. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia relativa del haplotipo y los colores representan la contribución de cada localidad al haplotipo. Los números representados en las ramas indican el número de cambios que dieron lugar al haplotipo.

## Análisis de la diversidad genética

El nivel de variación en cada una de las localidades analizadas medido como diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) se muestra en la Tabla II. La localidad de Maresme presentó los valores más altos de diversidad haplotípica en el gen CitB tipo F (0,915), Monte Gordo en el tipo M del mismo gen (0,848) y Fuengirola en el gen COI (0,949). Sin embargo, los valores más bajos se presentaron siempre en la localidad de Corme-Laxe. Todas las localidades presentaron valores altos y similares de diversidad haplotípica en las secuencias combinadas, pero una vez más Corme-Laxe refleja el valor más bajo. Globalmente, la diversidad haplotípica revelada individualmente por cada gen y por la combinación de los genes CitB tipo F y COI fue alta (CitB tipo F: 0,765; CitB tipo M: 0,830; COI: 0,907; CitB tipo F + COI: 0,960).

En cuanto a la diversidad nucleotídica, todas las localidades mostraron valores similares, excepto Maresme que tiene valores de un orden de magnitud mayor en el gen CitB tipo F y tipo M (0,011 y 0,022, respectivamente).

**Tabla II.** Estimaciones de diversidad genética en las secuencias de CitB (tipo F y tipo M), COI y en el combinado tipo F + COI.

Localidad	Gen	Tipo	CitB				COI				Tipo F + COI			
			$n$	Nh	$h$	$\pi$	$n$	Nh	$h$	$\pi$	$n$	Nh	$h$	$\pi$
Vilarrube	F		33	13	0,733	0,004	27	14	0,886	0,006	21	17	0,976	0,006
	M		16	10	0,825	0,009								
Corme-Laxe	F		28	10	0,593	0,004	28	9	0,741	0,005	27	14	0,858	0,004
	M		13	3	0,295	0,001								
Monte Gordo	F		26	15	0,828	0,005	30	15	0,853	0,008	26	20	0,951	0,007
	M		15	9	0,848	0,005								
Maresme	F		27	14	0,915	0,011	30	18	0,917	0,007	27	20	0,969	0,009
	M		13	8	0,808	0,022								
Fuengirola	F		21	9	0,629	0,005	30	23	0,949	0,009	21	18	0,971	0,007
	M		15	5	0,810	0,004								
TOTAL	F		135	47	0,765	0,006	145	60	0,907	0,008	122	78	0,960	0,007
	M		72	30	0,830	0,027								

$n$ : número de individuos analizados; Nh: número de haplotipos encontrados;  $h$ : diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica.

La Tabla III muestra los valores obtenidos para el estadístico  $F_S$  de Fu. Tanto para cada gen como para las secuencias combinadas, los valores de  $F_S$  fueron siempre negativos a excepción de la localidad de Maresme para el gen CitB tipo M. En la mayoría de los casos, los valores resultaron significativos, lo que indica posibles eventos de expansión poblacional. Las excepciones corresponden al gen CitB tipo M para las localidades de Corme-Laxe, Maresme y Fuengirola, y al gen COI para la localidad de Corme-Laxe.

**Tabla III.** Test  $F_S$  de Fu para los genes CitB (tipo F y tipo M) y COI y para la combinación de las secuencias de CitB tipo F + COI.

Gen	CitB	COI	Tipo F + COI	
Localidad	Tipo	$F_S$	$F_S$	
Vilarube	F	-8,846*	-7,422*	-10,022*
	M	-3,926*		
Corme-Laxe	F	-6,042*	-2,199	-5,513*
	M	-0,689		
Monte Gordo	F	-13,244*	-5,525*	-11,117*
	M	-5,723*		
Maresme	F	-4,769*	-11,217*	-8,444*
	M	0,170		
Fuengirola	F	-4,393*	-19,553*	-10,841*
	M	-0,635		
TOTAL	F	-62,568*	-34,363*	-98,843*
	M	-6,041		

\* Diferenciación significativa ( $P < 0,05$ ).

### Análisis de diferenciación poblacional

La estructura genética de las localidades fue analizada mediante el análisis AMOVA (Tabla IV). En todos los casos, tanto para cada gen individual como para la combinación de los genes CitB tipo F + COI, el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de las localidades.

Los valores de índice de fijación  $F_{ST}$  obtenido a partir de los haplotipos de los genes CitB tipo F, CitB tipo M, COI y de las secuencias combinadas fueron 0,03653, 0,14712, 0,04892 y 0,02355, respectivamente, siendo significativamente distintos de cero para todos los casos.

**Tabla IV.** Análisis molecular de la varianza (AMOVA).

Gen CitB tipo F					Gen CitB tipo M				
Fuente variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación	Fuente variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación
Entre localidades	4	2,996	0,014	3,65	Entre Localidades	4	5,069	0,063	14,71
Dentro localidades	130	48,248	0,371	96,35	Dentro localidades	67	24,403	0,346	85,29
<b>TOTAL</b>	134	51,24	0,385		<b>TOTAL</b>	71	29,472	0,427	
<b>Índice de fijación (<math>F_{ST}</math>)</b>			0,03653*		<b>Índice de fijación (<math>F_{ST}</math>)</b>			0,14712*	

Gen COI					CitB tipo F + COI				
Fuente variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación	Fuente variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación
Entre localidades	4	4,338	0,022	4,89	Entre localidades	4	2,989	0,012	2,35
Dentro localidades	140	60,952	0,435	95,11	Dentro localidades	117	55,102	0,471	97,65
<b>TOTAL</b>	144	65,29	0,458		<b>TOTAL</b>	121	58,09	0,482	
<b>Índice de fijación (<math>F_{ST}</math>)</b>			0,04892*		<b>Índice de fijación (<math>F_{ST}</math>)</b>			0,02355*	

g.l.: grados de libertad. \* Diferenciación significativa ( $P < 0,05$ ).

El cálculo del índice  $F_{ST}$  por pares de localidades se refleja en la Tabla V.

**Tabla V.** Valores  $F_{ST}$  por pares de localidades en CitB tipo F/CitB tipo M (diagonal superior) y COI/CitB tipo F + COI (diagonal inferior).

Localidad	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo	Maresme	Fuengirola
Vilarrube	-	-0,001/0,10*	-0,009/-0,024	0,069*/0,183**	-0,003/0,043
Corme-Laxe	0,012/0,011	-	0,018/0,128*	0,122**/0,449**	-0,020/0,222*
Monte Gordo	-0,010/-0,006	0,007/0,005	-	0,037*/0,172**	0,010/0,044
Maresme	0,084**/0,028*	0,154**/0,087**	0,101**/0,040**	-	0,102**/0,191**
Fuengirola	0,007/-0,001	0,040*/0,017	0,004/-0,007	0,056**/0,030**	-

\* Diferenciación significativa ( $P < 0,05$ ). \*\* Significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

En las 40 comparaciones realizadas, veinte tienen un valor de  $F_{ST}$  significativamente distinto de cero. Tras la corrección secuencial de Bonferroni, trece de las combinaciones resultaron significativas, incluyendo todas ellas a la localidad de Maresme.



## **Discusión**



Este trabajo aporta las primeras estimas de diversidad genética y estructura poblacional de la coquina *D. trunculus* en la Península Ibérica empleando parte de los genes mitocondriales CitB y COI como marcadores moleculares. En general, diferentes regiones del ADNmt, entre las que destaca el gen COI, son de uso común en estudios de genética de poblaciones en otras especies de moluscos bivalvos (Dahlgren *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2007; Baker *et al.*, 2008; Arruda *et al.*, 2009, Śmietanka *et al.*, 2013) pero es la primera vez que se analiza con este fin en *D. trunculus*. Sin embargo, aunque el gen CitB ha sido ampliamente utilizado en otros grupos animales (Arif & Khan, 2009), no es muy común en este tipo de estudios en moluscos bivalvos debido, probablemente, a la ausencia de cebadores específicos para amplificar este gen en los dos tipos de ADNmt (tipos F y M).

La existencia de DUI en *D. trunculus* (Theologidis *et al.*, 2008) y, por tanto, la presencia de dos tipos de genoma mitocondrial cuya distribución varía respecto al sexo y al tejido, es un factor importante que debe tenerse en cuenta ya que puede interferir en la interpretación de los resultados de estudios poblacionales (Ladoukakis *et al.*, 2002). Por este motivo, se realizó una prueba preliminar con los genes CitB y COI para comprobar su amplificación en los dos tipos de ADNmt (F y M). En el caso del gen CitB, se observaron grandes diferencias entre las secuencias aisladas a partir de músculo de ambos sexos y las secuencias aisladas de tejido gonadal de machos. El resultado del alineamiento con las secuencias de referencia CitB tipo F y M (GenBank EF417554.1 y EF417555.1, respectivamente) confirman que las secuencias obtenidas a partir de músculo son secuencias tipo F y las extraídas a partir de gónada de machos son M, coincidiendo con el patrón de distribución establecido en estudios previos (Theologidis *et al.*, 2008). Sin embargo, en el caso de las secuencias COI no se detectó una variación en el conjunto de individuos analizados. El resultado del alineamiento con la secuencia de referencia COI de *D. trunculus* (GenBank KC429143.1) descrita por Sharma *et al.* (2013) mostró un elevado grado de similitud con las secuencias obtenidas. Dada la ausencia de secuencias de referencia de COI en ambos tipos de ADNmt (F y M) así como de diferencias entre las secuencias obtenidas asociadas al sexo y al tejido, este gen se amplificó rutinariamente a partir de ADN extraído de músculo exclusivamente. Por tanto, es muy probable que las secuencias de los individuos estudiados correspondan al tipo F al haber extraído el ADN de tejido somático. La dificultad de identificar los dos tipos de COI (tipos F y M) puede ser debido a que: las diferencias entre ambos tipos de COI son tan pequeñas que dificultan su distinción, o bien, existen marcadas diferencias pero no se ha detectado, debido posiblemente a que los cebadores empleados sólo reconocen uno de los tipos. Además puede producirse contaminación de tejidos,

el tejido gonadal masculino contiene también tejido somático (Venetis *et al.*, 2006). Si los cebadores se unen preferentemente al tipo F (presente en el tejido somático), el tipo M presente en el tejido gonadal puede no ser detectado.

Los resultados obtenidos en este estudio nos indican que es importante tener en cuenta el sexo de los individuos y el tejido del que se va a extraer el ADN a la hora de planificar un estudio basado en ADNmt.

Los dos genes analizados en este trabajo fueron polimórficos en las cinco localidades examinadas, y mostraron valores totales similares, tanto de diversidad haplotípica como de diversidad nucleotídica, a excepción del gen CitB tipo M que mostró un valor de diversidad nucleotídica mucho mayor (0,027) que en el resto de los genes y las secuencias combinadas.

En el caso del CitB los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica total para los tipos F y M fueron de 0,765 y 0,006, y 0,830 y 0,027, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios de bivalvos, como es el caso de *Mytilus trossulus* (Śmietanka *et al.*, 2013) o *Mytilus californianus* (Ort & Pogson, 2007). Uno de los aspectos que destacan en relación con el conjunto de los resultados obtenidos en CitB es el elevado número de haplotipos encontrados. Esto se debe a que la mayor parte de haplotipos son privados y aparecen representados por uno o dos individuos dentro de una misma localidad. Esta enorme heterogeneidad es aún más llamativa en lo que a secuencias CitB tipo M se refiere, ya que en 72 individuos estudiados existen 30 haplotipos distintos, frente a 47 en el caso del tipo F donde el número de individuos analizados es casi el doble. Estos datos hacen que los valores de diversidad haplotípica sean en todos los casos próximos a uno, a excepción de la localidad de Corme-Laxe. Este resultado está en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores que demuestran la existencia de una mayor diversidad de haplotipos M en relación con los F en poblaciones naturales de *M. trossulus* (Śmietanka *et al.*, 2013) o en estudios previos sobre el ADNmt tipo F y M en mejillones de las familias Mitilidae (Hoeh *et al.*, 1996) y Unionidae (Liu *et al.*, 1996) y en almejas de la familia Veneridae (Passamonti & Scali, 2001), donde han establecido que el tipo M posee mayores niveles de polimorfismo y evoluciona más rápidamente que el tipo F. Se han propuesto varios mecanismos para explicar estos patrones. Por una parte, varios autores proponen que el genoma M puede experimentar una mayor tasa de mutación debido al gran número de divisiones celulares que tiene durante la espermatogénesis (siete divisiones) en comparación con la ovogénesis (cuatro) (Rawson & Hilbish, 1996; Stewart, *et al.*, 1996). Además, el genoma F tiene un tamaño efectivo de la

población mayor, debido a que aparece en ambos sexos, mientras que el genoma M está restringido a machos (Ladoukakis *et al.*, 2002).

En el gen COI, la diversidad haplotípica total (0,907) y la nucleotídica (0,008) resultó del orden de la observada en otras especies de bivalvos, como es el caso de la almeja *Mercenaria mercenaria*, donde se detectaron valores de 0,851 y 0,007 respectivamente (Baker *et al.*, 2008) o en *Ruditapes philippinarum*, 0,960 y 0,010 (Mao *et al.*, 2011) y del berberecho *Cerastoderma edule*, con valores de 0,866 y 0,005 (Krakau *et al.*, 2012).

Atendiendo a las secuencias combinadas, debe destacarse que únicamente se realizó la combinación de las secuencias CitB tipo F y COI porque ambas fueron amplificadas a partir de ADN extraído del mismo tejido (muscular). En este caso, la variación genética es similar en todas las localidades examinadas, detectándose niveles de diversidad haplotípica elevados (próximos a 1) y niveles de diversidad nucleotídica bajos ( $\sim 0,007$ ), a excepción de Corme-Laxe donde ambos valores son ligeramente más bajos (0,858 y 0,004). La menor diversidad de esta localidad en todos los genes podría estar relacionada con un menor tamaño efectivo de población, dado que teóricamente la variabilidad presente en una población está correlacionada positivamente con este parámetro poblacional (Fuji & Nishida, 1997).

La relación entre ambas medidas de diversidad, valores elevados de diversidad haplotípica y bajos de diversidad nucleotídica, indica la existencia de un proceso de expansión demográfica después de un periodo de bajo tamaño efectivo (Grant & Bowen, 1998). Esto concuerda con lo observado en las redes de haplotipos que mostraron estructuras en forma de estrella, una morfología característica de un crecimiento exponencial de las localidades después de un cuello de botella (Slatkin & Hudson, 1991). De igual modo, la presencia de un elevado número de haplotipos únicos y uno o dos haplotipos principales es un patrón común en otros organismos marinos (como en el crustáceo *Necora puber*) relacionado con las glaciaciones del Pleistoceno (Baker *et al.*, 2008; Sotelo *et al.*, 2009) e indicativo de una expansión reciente a partir de una población ancestral con pequeño tamaño efectivo. Esto resulta igualmente evidente en los datos obtenidos para el estadístico  $F_S$  de Fu, que al mostrar valores significativamente negativos en la mayoría de los casos también apoyan la aparente expansión poblacional.

Los resultados del AMOVA y los análisis  $F_{ST}$  de los genes CitB y COI de *D. trunculus* mostraron niveles bajos (a excepción del CitB tipo M), aunque significativos, de estructuración genética entre las cinco localidades estudiadas. En el estudio de la variación del ADNmt en *Mytilus galloprovincialis* llevado a cabo por Ladoukakis *et al.* (2002) el genoma F exhibió

mayor grado de diversidad dentro de las poblaciones, mientras que el genoma M presentó mayor grado de diferenciación entre poblaciones. Esto está relacionado con que el tipo M evoluciona más rápido que el tipo F, tal como se ha explicado anteriormente. No obstante, en nuestro estudio, a pesar de que el porcentaje de variación entre las localidades para el gen CitB tipo M aumenta respecto al tipo F, el mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de las localidades en todos los casos, tanto para cada gen individual como para la combinación de secuencias.

En las comparaciones de  $F_{ST}$  por pares de localidades, solamente la localidad de Maresme muestra diferenciación genética significativa tras la corrección secuencial de Bonferroni frente a las demás localidades estudiadas. Esto concuerda con las redes de haplotipos elaboradas para el gen CitB tipo M y las secuencias combinadas, donde todas las localidades comparten el haplotipo más común a excepción de Maresme, aportando evidencias de diferenciación genética entre la localidad catalana y todas las demás. Del mismo modo, aunque todas las localidades presentan haplotipos privados a muy bajas frecuencias, en la localidad de Maresme llegan a alcanzar hasta el 3,70%. Por tanto, nuestro estudio sugiere que a pesar de la inherente capacidad de la especie para dispersarse a través de su etapa larvaria planctónica, la estructuración geográfica se puede acumular. La diferenciación genética entre Maresme y el resto de localidades estudiadas podría relacionarse con la barrera hidrográfica Almería-Orán, de la que se sabe que afecta al flujo de genes de otras especies marinas. Esta observación fue llevada a cabo por Quesada *et al.* (1995) en la comparación entre el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico en un estudio sobre *M. galloprovincialis*. Esta barrera también afecta a la sardina *Sardina pilchardus* (Ramón & Castro, 1997), la lubina *Dicentrarchus labrax* (Naciri *et al.*, 1999) y el crustáceo *Meganyctiphanes norvegica* (Zane, *et al.*, 2000). Por otro lado, el Canal de Ibiza también podría ser la causa de esta diferenciación ya que ha demostrado tener un efecto en la estructura genética de otras especies marinas como es el caso de la gorgonia roja *Paramuricea clavata* (Mokhtar-Jamaï *et al.*, 2011), el pez *Serranus cabrilla* (Schunter *et al.*, 2011) y el crustáceo *Liocarcinus depurator* (García-Merchán *et al.*, 2012). Además de estas discontinuidades oceanográficas, la estructura de las poblaciones puede verse afectada por otros factores como la capacidad de dispersión larval, la colonización histórica y los procesos de adaptación locales, posibles responsables del patrón observado (García-Merchán *et al.*, 2012).

## **Conclusiones**





Este trabajo examina por primera vez la variación de los genes mitocondriales CitB y COI en *D. trunculus* de la costa de la Península Ibérica y aporta las primeras estimas de diversidad genética y diferenciación poblacional.

1. Los dos marcadores mitocondriales analizados en este trabajo fueron altamente polimórficos. Los análisis de las secuencias CitB tipo F y tipo M permitieron identificar 47 y 30 haplotipos, respectivamente. Mientras que, en el caso del gen COI se identificaron 60 haplotipos. Uno de los aspectos que destacan con relación al elevado número de haplotipos encontrados es que la mayor parte de ellos se debe a haplotipos privados, siendo Fuengirola la localidad con mayor número de ellos en el gen COI, y Maresme en CitB (tipo F y M) y secuencias combinadas.

2. En todos los casos, las relaciones inferidas entre los haplotipos mostraron una estructura estrellada revelando un proceso de expansión poblacional después de un cuello de botella. Asimismo, en el caso del gen CitB tipo M destaca la existencia de 2 haplogrupos, estando constituido uno de ellos únicamente por haplotipos de la localidad de Maresme.

3. Con respecto al análisis de diversidad genética, las cinco localidades examinadas mostraron valores elevados de diversidad haplotípica y bajos de diversidad nucleotídica, detectándose una aparente expansión demográfica. De igual modo, esto es apoyado por los valores obtenidos para el estadístico  $F_S$  de Fu.

4. Los análisis de diferenciación poblacional mostraron niveles bajos, aunque significativos, de estructuración genética entre las cinco localidades. La mayor parte de la diferenciación se encuentra dentro de las localidades, superando el 95% en todos los casos, excepto en el caso del gen CitB tipo M (85%). El cálculo del índice  $F_{ST}$  por pares mostró que todas las combinaciones que resultaron significativas tras la corrección secuencial de Bonferroni incluían a la localidad de Maresme, indicando evidencias de diferenciación genética entre la localidad catalana y todas las demás.



## **Referencias Bibliográficas**



- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1997). *Basic local alignment search tool*. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- Arif I.A. & Khan H.A. (2009). *Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review*. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32: 9-17.
- Arruda C.C., Beasley C.R., Vallinoto M., Marques-Silva N.d.S. & Tagliaro C.H. (2009). *Significant genetic differentiation among populations of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791): A bivalve with planktonic larval dispersión*. *Genetics and Molecular Biology*. 32: 423-430
- Avice J.C. (1989). *Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology*. *Evolution*. 43: 1192-1208.
- Avice J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. (1987). *Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics*. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489-522.
- Baker P., Austin J.D., Bowen B.W. & Baker S.M. (2008). *Range-wide population structure and history of the northern quahog (*Merceneria merceneria*) inferred from mitochondrial DNA sequence data*. *Journal of Marine Science*. 65: 155-163.
- Ballard J.W.O. & Rand D.M. (2005). *The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications*. *Annual Review Of Ecology Evolution And Systematics*. 36: 621-642.
- Ballard J.W.O. & Whitlock M.C. (2004). *The incomplete natural history of mitochondria*. *Molecular Ecology*, 13, 729-744.
- Bandelt H.J., Forster P. & Rohl A. (1999). *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies*. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- Bayed A. & Guillou J. (1985). *Contribution a l'étude des populations du genre *Donax*: la population de *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdiya (Maroc)*. *Annales de l'Institut Oceanographique* 61: 139-147.
- Birky C.W., Maruyama T. & Fuerst P. (1983). *An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results*. *Genetics*. 103: 513-527.
- Birky C.W. (1995). *Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 11331- 11338.
- Boore J.L. (1999). *Animal mitochondrial genomes*. *Nucleic Acids Research*. 27: 1767-1780.
- Boyle E.E. & Etter R.J. (2013). *Heteroplasmy in a deep-sea protobranch bivalve suggests an ancient origin of doubly uniparental inheritance of mitochondria in *Bivalvia**. *Marine Biology*. 160: 413-422.
- Breton S., Doucet-Beaupré H., Stewart D.T., Hoeh W.R. & Blier P.U. (2007). *The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?* *Trends in Genetics*. 23: 465-474.
- Breton S., Doucet-Beaupré H., Stewart D.T., Piontkivska H., Karmakar M., Bogan A.E., Blier P.U. & Hoeh W.R. (2009). *Comparative Mitochondrial Genomics of Freshwater Mussels (*Bivalvia: Unionoida*) With Doubly Uniparental Inheritance of mtDNA: Gender-Specific Open Reading Frames and Putative Origins of Replication*. *Genetics*. 183: 1575-1589.
- Cavalli-Sforza L.L. & Edwards A.W.F. (1967). *Phylogenetic analysis models and estimation procedures*. *American Journal of Human Genetics*. 19: 233-257.

- Chícharo L.; Chícharo A., Gaspar M., Alves F. & Regala J. (2002). *Ecological characterization of dredged and non-dredged bivalve fishing areas off south Portugal*. Journal Marine Biological Association of the UK. 82: 41-50.
- Cho E.S., Jung C.G., Sohn S.G., Kim C.W. & Han S.J. (2007). *Population Genetic Structure of the Ark Shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia Based on COI Gene Sequences*. Marine Biotechnology. 9: 203-285.
- Cornet M. & Soulard C. (1990). *Chromosome number and karyotype of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea)*. Genetica. 82: 93-97.
- Dahlgren T.G., Weinberg J.R. & Halanych K.M. (2000). *Phylogeography of the ocean quahog (*Arctica islandica*): influences of paleoclimate on genetic diversity and species range*. Marine Biology. 137: 487-495.
- Excoffier L. & Lischer H.E. L. (2010). *Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows*. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.
- Felsenstein J. (1993). *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 3.5c*. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fernández-Tajes J. & Méndez J. (2007). *Identification of the Razor Clam Species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* Using PCR-RFLP Analysis of the 5S rDNA Region*. Journal Agric Food Chemistry. 55: 7278-7282.
- Fisher C. & Skibinski D.O.F. (1990). *Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus**. Proceedings of The Royal Society of London B. 242: 149-156.
- Fu Y.X. (1997). *Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection*. Genetics. 147: 915-925.
- Fuji T. & Nishida M. (1997). *High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus**. Fisheries Science. 63: 906-910.
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S. & Hurst G.D.D. (2009). *Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal*. Molecular Ecology. 18: 4541-455.
- García-Merchán V.H., Robainas-Barcia A., Abelló P., Macpherson E., Palero F., García-Rodríguez M., Gil de Sola L. & Pascual M. (2012). *Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic–Mediterranean transition*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 62: 664-672.
- Gaspar M.B., Ferreira R. & Monteiro C.C. (1999). *Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal*. Fisheries Research. 41: 309-316.
- Gissi C., Iannelli F. & Pesole G. (2008). *Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species*. Heredity. 101: 301-320.
- González-Tizón A., Martínez-Lage A., Marinas L., Freire R., Cornudella L. & Méndez Y. (1998). *Cytogenetic characterization of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia)*. Cytogenetics and Cell Genetics. 81: 109-109.
- Grant W.S. & Bowen B.W. (1998). *Shallow population histories in Deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation*. The American Genetic Association. 89: 415-426.

- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. & de Waard J.R. (2003). *Biological identifications through DNA barcodes*. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 270: 313-321.
- Hoeh W.R., Blakley K.H. & Brown W.M. (1991). *Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of Mytilus mitochondrial-DNA*. *Science*. 251: 1488-1490.
- Hoeh W.R., Stewart D.T., Sutherland B.W., Zouros E. (1996). *Cytochrome c oxidase sequence comparisons suggest an unusually high rate of mitochondrial DNA evolution in Mytilus (Mollusca: Bivalvia)*. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 418-421.
- Hoeh W.R., Stewart D.T. & Guttman S.I. (2002). *High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea)*. *Evolution*. 56: 2252-2261.
- Hoffman R.J., Boore J.L. & Brown W.M. (1992). *A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, Mytilus edulis*. *Genetics*. 131: 397-412.
- Joaquim S., Pereira J., Leitão A., Matias D., Chaves R., Guedes-Pinto H., Chícharo L. & Gaspar M. (2010). *Genetic diversity of two Portuguese populations of the pullet carpet shell Venerupis senegalensis, based on RAPD markers: contribution to a sustainable restocking program*. *Helgoland Marine Research*. 64: 289-299.
- Krakau M., Jacobson S., Jensen K.T. & Reise K. (2012). *The cockle Cerastoderma edule at Northeast Atlantic shores: genetic signatures of glacial refugia*. *Marine Biology*. 159: 221-230.
- Ladoukakis E.D., Saavedra C., Magoulas A. & Zouros E. (2002). *Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of Mytilus galloprovincialis from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea*. *Molecular Ecology*. 11: 755-769.
- Liu H-P, Mitton J.B. & Wu S-K. (1996). *Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal mitochondrial DNA and allozyme differentiation in the freshwater mussel Anodonta grandis grandis*. *Evolution*. 50: 952-957.
- Mao Y., Gao T., Yanagimoto T. & Xiao Y. (2011). *Filogeografía molecular de Ruditapes philippinarum en el Océano Pacífico Noroeste basado en gen COI*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 407: 171-181.
- Mokhtar-Jamaï K., Pascual M., Ledoux J.B., Coma R., Féral J.P., Garrabou J. & Aurelle D. (2011). *From global to local genetic structuring in the red gorgonian Paramuricea clavata: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal*. *Molecular Ecology*. 20: 3291-3305.
- Molares J., Parada J.M., Navarro-Pérez E. & Fernández A. (2008). *Variabilidad interanual de las ventas de los principales recursos marisqueros de Galicia y su relación con las condiciones ambientales*. *Revista Galega dos Recursos Mariños (Artículos e Informes técnicos)*. 2: 1-42.
- Moritz C., Dowling T.E. & Brown W.M. (1987). *Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics*. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 269-292.
- Naciri M., Lemaire C., Borsa P., Bonhomme F. (1999). *Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (Dicentrarchus labrax)*. *Journal of Heredity*. 90: 591-596.
- Nantón A., Arias-Pérez A., Méndez J. & Freire R. (2014). *Characterization of nineteen microsatellite markers and development of multiplex PCRs for the wedge clam Donax trunculus (Mollusca: Bivalvia)*. *Molecular Biology Reports*. doi: 10.1007/s11033-014-3406-0.

- Nei M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Ort B.S. & Pogson G.H. (2007). *Molecular Population Genetics of the Male and Female Mitochondrial DNA Molecules of the California Sea Mussel, Mytilus californianus*. *Genetics* 177: 1087-1099.
- Passamonti M. & Scali V. (2001). *Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia)*. *Current Genetics*. 39: 117-124.
- Pereira A.M., Fernández-Tajes J., Gaspar M.B. & Méndez J. (2012). *Identification of the wedge clam *Donax trunculus* by a simple PCR technique*. *Food Control*. 23: 268-270.
- Petrovic V. & Plohl M. (2005). *Sequence divergence and conservation in organizationally distinct subfamilies of *Donax trunculus* satellite DNA*. *Gene*. 362: 37-43.
- Petrovic V., Pérez-García C., Pasantes J.J., Satovic E., Prats E. & Plohl M. (2009). *A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: a dominance of GC-rich heterochromatin*. *Cytogenetic and Genome Research*. 124: 63-71.
- Plohl M. & Cornudella L. (1996). *Characterization of a complex satellite DNA in the mollusc *Donax trunculus*: Analysis of sequence variations and divergence*. *Gene*. 169: 157-164.
- Plohl M. & Cornudella L. (1997). *Characterization of interrelated sequence motifs in four satellite DNAs and their distribution in the genome of the mollusc *Donax trunculus**. *Journal of Molecular Evolution*. 44: 189-198.
- Plohl M., Prats E., Martínez-Lage A., González-Tizón A., Méndez J. & Cornudella L. (2002). *Telomeric localization of the vertebrate-type hexamer repeat, (TTAGGG)(n), in the wedgeshell clam *Donax trunculus* and other marine invertebrate genomes*. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 19839-19846.
- Quesada H., Beynon C.M., Skibinski D.O. (1995). *A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation*. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 521-524.
- Ramón M., Cano J., Peña J.B. & Campos M.J. (2005). *Current status and perspectives of mollusc (bivalves and gastropods) culture in the Spanish Mediterranean*. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*. 21:361-373.
- Ramón M.M. & Castro J.A. (1997). *Genetic variation in natural stocks of *Sardina pilchardus* (sardines) from the western Mediterranean Sea*. *Heredity*. 78: 520-528.
- Rawson P.D. & Hilbish T.J. (1996). *Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex*. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 893- 901.
- Rice W.R. (1989). *Analyzing tables of statistical tests*. *Evolution*. 43: 223-225.
- Rozas J. (2009). *DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP*. Pp. 337-350. In Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537*. Humana Press, NJ, USA.
- Satovic E. & Plohl M. (2013). *Tandem Repeat-Containing MITEs in the Clam *Donax trunculus**. *Genome Biology and Evolution*. 5: 2549-2559.



- Schunter C., Carreras-Carbonell J., Macpherson E., Tintoré J., Vidal-Vijande E., Pascual A., Guidetti P. & Pascual M. (2011). *Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species*. *Molecular Ecology*. 20: 5167-5181.
- Sharma P.P., Zardus J.D., Boyle E.E., González V.L., Jennings R.M., McIntyre E., Wheeler W.C., Etter R.J. & Giribet G. (2013). *Into the deep: a phylogenetic approach to the bivalve subclass Protobranchia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 69: 188-204.
- Skibinski D.O.F., Gallagher C. & Beynon C.M. (1994a). *Mitochondrial DNA inheritance*. *Nature*. 386: 817-818.
- Skibinski D.O.F., Gallagher C. & Beynon C.M. (1994b). *Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the mussel *Mytilus edulis**. *Genetics*. 138: 801-809.
- Slatkin M. & Hudson R.R. (1991). *Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations*. *Genetics*. 129: 555-562.
- Śmietanka B., Zbawicka M., Sańko T., Wenne R. & Burzyński A. (2013). *Molecular population genetics of male and female mitochondrial genomes in subarctic *Mytilus trossulus**. *Marine Biology*. 160: 1709-1721.
- Sotelo G., Posada D. & Moran P. (2009). *Low-mitochondrial diversity and lack of structure in the velvet swimming crab *Necora puber* along the Galician coast*. *Marine Biology*. 159: 1039-1048.
- Stewart D.T., Kenchington E.R., Singh R.K. & Zouros E. (1996). *Degree of selective constraint as an explanation of the different rates of evolution of gender-specific mitochondrial DNA lineages in the mussel *Mytilus**. *Genetics*. 143: 1349-1357.
- Tebble N. (1966). *British bivalve sheashells. A Handbook for Identification*. London: The British Museum (Natural History).
- Thébaud O., Véron G. & Fifas S. (2005). *Incidences des épisodes d'efflorescences de micro algues toxiques sur les écosystèmes et sur les pêcheries de coquillages en baie de Douarnenez*. In: Rapport Ifremer R.INT.DCB/DEM – DCB/STH/UDPP 05-010. Brest, France. 88.
- Theologidis I., Fodelianakis S., Gaspar M.B. & Zouros E. (2008). *Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problema of its sporadic detection in *Bivalvia**. *Evolution*. 62: 959-970.
- Thompson J.D., Higgins D. & Gibson T.J. (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- Venetis C., Theologidis I., Zouros E. & Rodakis G.C. (2006). *No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males*. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*. 273: 2483-2489.
- Walsh P.S., Metzger D.A. & Higuchi R. (1991). *Chelex-100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material*. *Biotechniques*. 10: 506-513.
- Ward R.D. (2006). *The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes*. *Fisheries Research*. 80: 9-18.
- Warrior R. & Gall J. (1985) *The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules*. *Archives des Sciences, Geneva*. 38:439-445.

- Wolstenholme D.R. (1992). *Animal mitochondrial DNA: structure and evolution*. International Review of Cytology. 141: 173-216.
- Wolstenholme D.R., Macfarlane J.L., Okimoto R., Clary D.O. & Wahleithner J.A. (1987). *Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84: 1324-1328.
- Zane L., Ostellari L., Maccatrozzo L., Bargelloni L., Cuzin-Roudy J., Buchholz F. & Patarnello T. (2000). *Genetic differentiation in a pelagic crustacean (Meganyctiphanes norvegica: Euphausiacea) from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea*. Marine Biology. 136: 191-199.
- Zeichen M.M., Agnesi S., Mariani A., Maccaroni A. & Ardizzone G.D. (2002). *Biology and population dynamics of Donax trunculus L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy)*. Estuarine, Coastal and Shelf Science. 54: 971-982.
- Zouros E., Freeman K.R., Ball A.O. & Pogson G.H. (1992). *Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel Mytilus*. Nature. 359: 412-414.
- Zouros E., Ball A.O., Saavedra C. & Freeman K.R. (1994a). *Mitochondrial DNA inheritance*. Nature. 386: 818.
- Zouros E., Ball A.O., Saavedra C. & Freeman K.R. (1994b). *An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel Mytilus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91: 7463-7467.

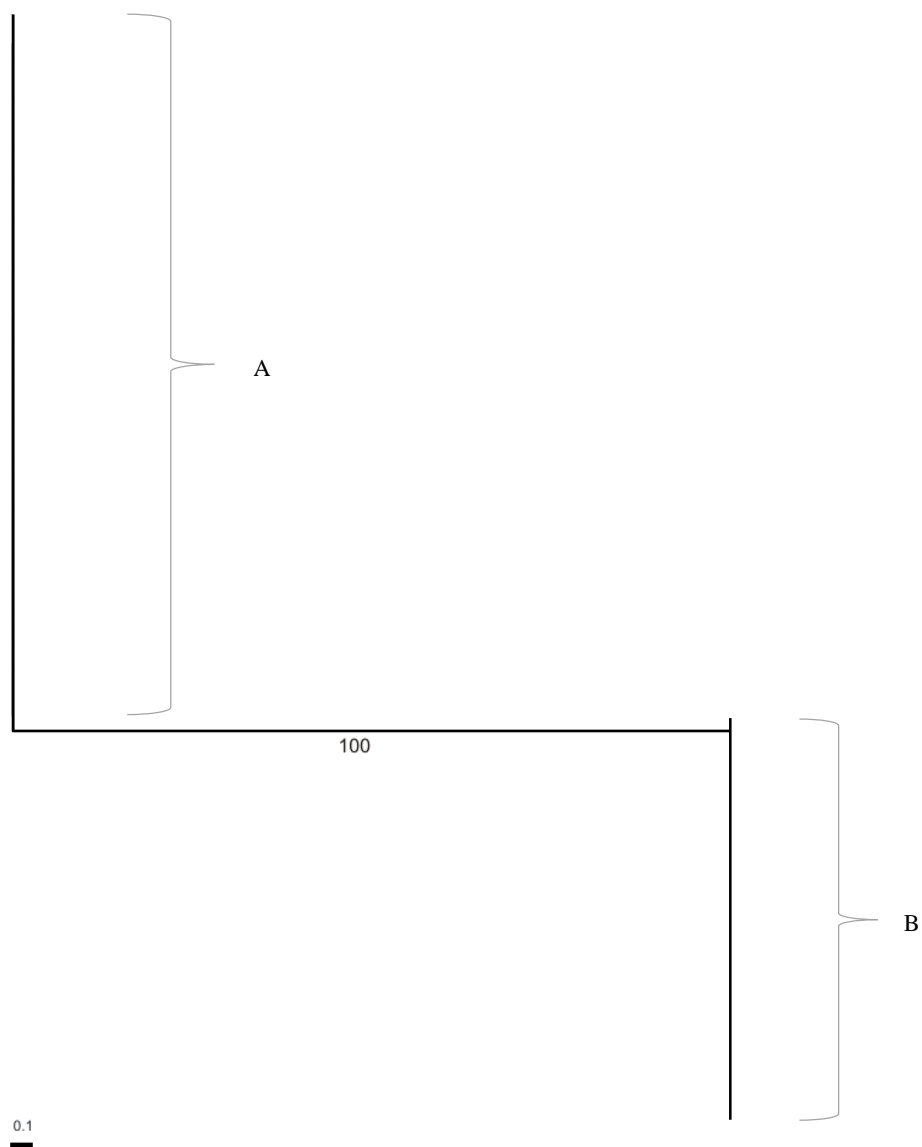
#### **REFERENCIAS WEB**

- Consellería do medio rural e do mar, Xunta De Galicia. (s.f.). *Plataforma tecnolóxica da pesca*. Recuperado el 17 de marzo de 2014, de <http://www.pescadegalicia.com/>

## **Anexos**



**Anexo I.** Árbol filogenético inferido mediante el algoritmo *Neighbour-joining* a partir de las frecuencias de las secuencias del gen CitB. (A) cluster que incluye las secuencias amplificadas a partir de músculo de ambos sexos (tipo F) y (B) cluster que incluye las secuencias obtenidas a partir de gónada de machos (tipo M). El número del nodo indica el valor bootstrap obtenido para 10.000 réplicas.







**Anexo IV.** Frecuencia absoluta de los 47 haplotipos del gen CitB tipo F en las cinco localidades examinadas.

H A P	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo	Maresme	Fuengirola	TOTAL	%
1	17	18	11	6	13	65	48,15
2	1					1	0,74
3	2	1	2			5	3,70
4	3					3	2,22
5	1	1				2	1,48
6	2		1	1		4	2,96
7	1					1	0,74
8	1	2	1		1	5	3,70
9	1					1	0,74
10	1	1				2	1,48
11	1		1			2	1,48
12	1					1	0,74
13	1					1	0,74
14		1				1	0,74
15		1				1	0,74
16		1				1	0,74
17		1				1	0,74
18		1				1	0,74
19			1			1	0,74
20			1			1	0,74
21			1			1	0,74
22			1			1	0,74
23			1			1	0,74
24			1			1	0,74
25			1			1	0,74
26			1			1	0,74
27			1			1	0,74
28			1			1	0,74
29				1		1	0,74
30				2		2	1,48
31				1		1	0,74
32				2		2	1,48
33				5		5	3,70
34				1		1	0,74
35				3		3	2,22
36				1		1	0,74
37				1		1	0,74
38				1		1	0,74
39				1		1	0,74
40				1		1	0,74
41					1	1	0,74
42					1	1	0,74
43					1	1	0,74
44					1	1	0,74
45					1	1	0,74
46					1	1	0,74
47					1	1	0,74
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>28</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>21</b>	<b>135</b>	<b>100</b>



**Anexo V.** Frecuencia absoluta de los 30 haplotipos del gen CitB tipo M en las cinco localidades examinadas.

H A P	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo	Maresme	Fuengirola	TOTAL	%
1	1		1			2	2,78
2	1					1	1,39
3	7	11	6		5	29	40,28
4	1		1			2	2,78
5	1					1	1,39
6	1					1	1,39
7	1					1	1,39
8	1					1	1,39
9	1					1	1,39
10	1					1	1,39
11	0	1				1	1,39
12		1				1	1,39
13			1			1	1,39
14			1			1	1,39
15			1			1	1,39
16			2			2	2,78
17			1			1	1,39
18			1			1	1,39
19				1		1	1,39
20				1		1	1,39
21				1		1	1,39
22				6		6	8,33
23				1		1	1,39
24				1		1	1,39
25				1		1	1,39
26				1		1	1,39
27					3	3	4,17
28					4	4	5,56
29					2	2	2,78
30					1	1	1,39
<b>TOTAL</b>	16	13	15	13	15	72	100



**Anexo VII.** Frecuencia absoluta de los 60 haplotipos del gen COI en las cinco localidades examinadas.

H A P	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo	Maresme	Fuengirola	TOTAL	%
1	5	2	3	1		11	7,59
2	8	14	11	1	7	41	28,28
3	1					1	0,69
4	1				1	2	1,38
5	1					1	0,69
6	1		1			2	1,38
7	1					1	0,69
8	1	2				3	2,07
9	2	3				5	3,45
10	1					1	0,69
11	2	1	4		2	9	6,21
12	1					1	0,69
13	1	2	1			4	2,76
14	1					1	0,69
15		2				2	1,38
16		1				1	0,69
17		1				1	0,69
18			1			1	0,69
19			1			1	0,69
20			1			1	0,69
21			1			1	0,69
22			1		1	2	1,38
23			1			1	0,69
24			1			1	0,69
25			1			1	0,69
26			1			1	0,69
27			1			1	0,69
28				1		1	0,69
29				8		8	5,52
30				2	1	3	2,07
31				1		1	0,69
32				1		1	0,69
33				1		1	0,69
34				1		1	0,69
35				2		2	1,38
36				1		1	0,69
37				1		1	0,69
38				4		4	2,76
39				1		1	0,69
40				1		1	0,69
41				1	1	2	1,38
42				1		1	0,69
43				1		1	0,69
44					1	1	0,69
45					1	1	0,69
46					1	1	0,69
47					1	1	0,69
48					1	1	0,69
49					1	1	0,69
50					1	1	0,69
51					1	1	0,69
52					1	1	0,69
53					1	1	0,69
54					1	1	0,69
55					1	1	0,69
56					1	1	0,69
57					1	1	0,69
58					1	1	0,69
59					1	1	0,69
60					1	1	0,69
<b>TOTAL</b>	27	28	30	30	30	145	0

**Anexo VIII.** Frecuencia absoluta de los 78 haplotipos de las secuencias combinadas en las cinco localidades examinadas.

H	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo	Maresme	Fuengirola	TOTAL	%
1	2	1	2			5	4,10
2	1					1	0,82
3	1					1	0,82
4	1					1	0,82
5	3	10	6		4	23	18,85
6	1					1	0,82
7	1	1				2	1,64
8	2	3				5	4,10
9	1					1	0,82
10	1					1	0,82
11	1	2	1			4	3,28
12	1					1	0,82
13	1					1	0,82
14	1	1				2	1,64
15	1					1	0,82
16	1					1	0,82
17	1					1	0,82
18		1				1	0,82
19		1				1	0,82
20		1				1	0,82
21		1				1	0,82
22		2				2	1,64
23		1				1	0,82
24		1				1	0,82
25		1				1	0,82
26			1			1	0,82
27			1			1	0,82
28			1			1	0,82
29			1		1	2	1,64
30			1			1	0,82
31			1			1	0,82
32			1			1	0,82
33			1			1	0,82
34			1			1	0,82
35			1			1	0,82
36			1			1	0,82
37			1			1	0,82
38			1			1	0,82
39			1			1	0,82
40			1			1	0,82
41			1			1	0,82
42			1			1	0,82
43				1		1	0,82
44				1		1	0,82
45				2		2	1,64
46				1		1	0,82
47				1		1	0,82
48				1		1	0,82
49				4		4	3,28
50				1		1	0,82
51				1		1	0,82
52				1		1	0,82
53				2		2	1,64
54				1		1	0,82
55				3		3	2,46
56				1		1	0,82
57				1		1	0,82
58				1		1	0,82
59				1		1	0,82
60				1		1	0,82

**Continuación Anexo VIII.** Frecuencia absoluta de los 78 haplotipos de las secuencias combinadas en las cinco localidades examinadas.

H	A	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo	Maresme	Fuengirola	TOTAL	%
61					1		1	0,82
62					1		1	0,82
63						1	1	0,82
64						1	1	0,82
65						1	1	0,82
66						1	1	0,82
67						1	1	0,82
68						1	1	0,82
69						1	1	0,82
70						1	1	0,82
71						1	1	0,82
72						1	1	0,82
73						1	1	0,82
74						1	1	0,82
75						1	1	0,82
76						1	1	0,82
77						1	1	0,82
78						1	1	0,82
<b>TOTAL</b>		21	27	26	27	21	122	100

